

C-reactive protein · Lipoproteins (CRP · LP) 複合体の抗炎症剤による解離

喜多尾浩代・桑島 士郎*

Dissociation of C-reactive protein · Lipoproteins Complex by Anti-inflammatory Chemical.

Hiroyo KITAO, Shiroh KUWAJIMA*

緒 言

C-reactive protein (CRP) は、1930年に Tillet と Francis¹⁾ によって、肺炎双球菌のC多糖体と結合し沈降反応をおこす蛋白質として初めて報告され、その後、肺炎球菌性肺炎患者以外の感染症、急性の組織障害、炎症において、血中などに増加することが明らかにされた急性期蛋白の代表的成分である^{2),3)}。そのため現在、血清中のCRP濃度は、炎症および組織障害性疾患の有無や、重症度の判定などに広く用いられている。

CRPは、炎症などの刺激によって肝臓における産生量が数百倍に増加し、その結果血中濃度が上昇するが、正常血清中にも微量ながら存在しているため、その生物学的意義に興味を持たれてきた。CRPの生物活性は、当初CRPとC多糖体の結合特性から検討され、CRPはC多糖体のリン酸コリン部に結合することが、VolanakisやKaplan^{4),5)}によって明らかにされた。リン酸コリンは細胞膜内のリン脂質をはじめ、生体内に広く分布しているため、CRPとリン酸コリンの結合が注目され、その生物学的意義を説明しようと多くの研究が試みられてきた。しかしながら、CRPはリン酸もコリンも持っていないtype 4のC多糖体にも結合すること、さらにリン酸モノエステルやポリカチオンなどにも結合することが明らかにされ⁶⁾、桑島らも^{7),8)}、リン酸コリンとは異なるリガンを持つアフィニティーゲルすなわちε-Aminocaproic acid-agaroseを用いた研究により、CR

PがCa²⁺存在下でε-Aminocaproic acidと結合することを確認した。この様に、in vivoにおけるCRPの生理学的機能と病理学的役割を明らかにするためには、CRPの生物活性を、リン酸コリンとの関係に限らず、他のリガンドとの結合性からも検討する必要がある。

またヒトCRPは、WHOの高脂血症分類によるIII型、IV型、およびV型高脂血症患者の血清内において、Ca²⁺依存性に血清 lipoproteins (LP) と結合し、複合体を形成することが、PepysやRoweらによって報告されている^{9),10)}。さらに、ウサギを用いた病理組織学的研究では、心筋梗塞の壊死および炎症部位にCRPが沈着していることや、マクロファージ由来の泡沫細胞が集簇するアテローム硬化巣およびアテローム硬化動脈の内膜に、CRPが存在することを報告している^{11),12)}。上記の報告は、泡沫化の起因となるマクロファージによるLPの取り込みに対し、CRPが影響を与える可能性を示唆している。

そこで筆者らは、CRPとLPの結合性および、CRP · LP複合体のマクロファージによる取り込みについて、これまでin vitroにおいて検討してきた。その結果ヒトCRPは、高脂血清ならびに境界域血清中のLPと複合体を形成することを明らかにし、さらにその複合体の活性化マクロファージによる取り込み率は、LP単独に比べて有意に高値であることを確認した¹³⁾。すなわち、CRPが結合した高脂血症患者血清中のLPは、活性化マクロファージに取り

込まれ、その後マクロファージは泡沫化に進展して、アテローム硬化の発生をもたらす可能性を示してきた。

そこで本研究では、上述した先行研究におけるCRPとLPの結合性を重視し、アテローム硬化の一つの発生機序に関与すると考えられるCRP・LP複合体の合成を阻止する化学物質を検索し、その薬物の抗アテローム硬化剤としての効果に関する検討を試みた。

1. 試料および方法

1. 高脂血清および正常血清

total cholesterol (T-chol) 220mg/dl 以上, triglyceride (TG) 150mg/dl 以上の両方の基準を満たし、かつCRP濃度が正常な (0.4mg/dl 以下) 血清を高脂血清とした。また、T-chol 130mg/dl 以上180mg/dl 未満であり、TG50mg/dl 以上110mg/dl 未満の両方の基準を満たし、かつCRP濃度が正常な (0.4mg/dl 以下) 血清を正常血清とした。入手した高脂血清および正常血清は、プール血清として4℃で保存し、7日以内に使用した。

2. ヒトCRP

ヒトCRPは、CRP高値血清からアフィニティーカラム法¹⁴⁾により分離精製し凍結乾燥したものを、大阪市立大学医学部臨床検査医学教室から譲り受けた。

3. アフィニティークロマトグラフィー

0.5×7 (cm) のカラムに、0.5M NaCl 溶液で膨潤させた6-amino-n-hexanoic acid (=ε-Aminocaproic acid)-sepharose 4B (Sigma Chemical Co., USA) 5ml を充填し、100ml の蒸留水でゲルを洗浄してアフィニティークラムとした。その後、このアフィニティークラムを200ml 以上の Buffer A (150mM NaCl, 20mM 2-amino-2-hydroxymethyl-1, 3-propanediol [=Tris (hydroxymethyl) aminomethane], 10mM CaCl, 10mM NaN₃, PH 7.8) で平衡

化し、CRPを溶解 (1 mg/ml) した Buffer A 3 ml をアフィニティークラムに流して、CRPをゲルに吸着させた。吸着後、このゲルを Buffer A 100ml 以上で洗浄し、アフィニティークラムから溶出された溶液を0.1ml ずつ採取して、各々を3 ml の蒸留水で希釈した。この希釈液中の蛋白濃度を測定し、未吸着CRPの溶出が完了したことが確認できるまで、アフィニティークラムの洗浄を施した。次に抗炎症剤である trans-4-(aminomethyl)-cyclohexane-carboxylic acid (=Tranexamic acid) 110mM 添加 Buffer A 100ml をアフィニティークラムに流し、溶出された溶液を0.1ml ずつ採取した。採取液は3 ml の蒸留水で希釈し、希釈液中の蛋白濃度を測定して、CRPの溶出態度を観察することにより、Tranexamic acid がCRPのリガンドになり得るか否かを検討した。

Tranexamic acid 添加 Buffer A による溶出操作後、ゲルを Buffer B (100mM NaCl, 50mM Tris (hydroxymethyl) aminomethane, 30mM trisodium citrate, 10mM ethylenediamine-tetra acetic acid 2Na (=EDTA · 2Na), 10 mM NaN₃, pH 7.8) で洗浄し、その際溶出された溶液中の蛋白濃度を測定することによって、Tranexamic acid 添加 Buffer A では溶出されなかったCRPの有無を確認した。

4. ゲル濾過

1.6×100 (cm) のカラムに、Sephacryl S-300 (Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden) 200ml を充填し、1000ml の蒸留水でゲルを洗浄した後、Buffer C (140mM NaCl, 10mM Tris (hydroxymethyl) aminomethane, 2.5mM CaCl, 10mM NaN₃, pH 7.8) 2000ml で平衡化した。このゲルに正常血清10ml, CRP 3.0mg 添加正常血清10ml (CRP 添加後30分室温放置)、高脂血清10ml あるいは、CRP 3.0mg 添加高脂血清10ml (CRP 添加後30分室温放置) を各々注入し、Buffer C 約3000ml を用いてゲル濾過した。

また、同じカラム中のゲルを1000mlの1 M NaClと蒸留水で洗浄後、Tranexamic acid 10 mM 添加 Buffer C 2000ml で平衡化した。このゲルにはCRP 3.0mg 添加高脂血清10ml (CRP 添加後30分室温放置)を注入し、Tranexamic acid 10mM 添加 Buffer C 約3000ml を用いてゲル濾過を行った。

これらのゲル濾過の際、溶出スピードは10 ml/hr とし、溶出された溶液を3.0ml ずつ採取した。そして溶出操作後、各フラクション溶液中の蛋白質濃度ならびにCRP濃度を測定した。

5. 蛋白質の測定

溶液中の蛋白質濃度は、紫外外部吸収法 (UV 法) に従い、吸収波長280nm における吸光度によって測定した。

6. CRPの定量

CRPの濃度は(0.02mg/dl 以上)、ラテックス凝集ネフェロメトリー法(LA 法)により、LX-3000 (アルファテックス株式会社, 東京) を用いて定量した。また、CRP濃度の微量測定は(0.02mg/dl 以下)、ラテックス凝集と粒子計数技術を融合させたカウンティング免疫測定法(CIA 法)により、Sysmex PAMIA-10 (東亜医用電子株式会社, 神戸) を用いて行った。

II. 結果および考察

1. CRP・LP複体の確認試験

正常血清単独をSephacryl S-300を用いてBuffer Cによってゲル濾過した結果、CRPの溶出パターンは一峰性を示した (Fig. 1. top)。また、CRP添加正常血清を同様にしてゲル濾過した時には、正常血清単独をゲル濾過した結果と類似した、一峰性のCRP溶出パターンが認められた (Fig. 1. bottom)。

次に高脂血清単独をゲル濾過した結果、CRPの溶出パターンは、正常血清単独をゲル濾過した時に認められるピークの前に、もう一つの

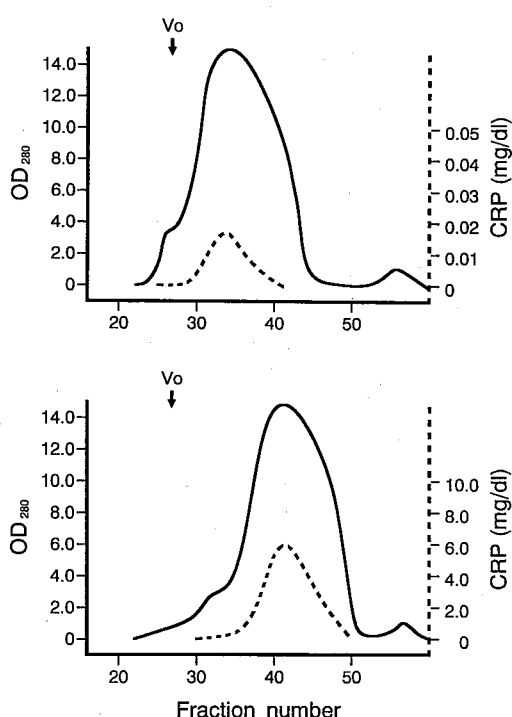


Fig. 1. Gel filtration of normal human sera and normal human sera in which human CRP was added to give a final concentration of 30mg/dl. Elution buffer was Tris-saline- Ca^{2+} solution.

溶出ピークを示した (Fig. 2. top)。さらに、CRP添加高脂血清をゲル濾過した時のCRP溶出パターンは、高脂血清単独をゲル濾過した結果とほぼ同様の二峰性を示した (Fig. 2. bottom)。

これまで筆者らは、Sephacryl S-300カラムクロマトグラフィーによるゲル濾過システムを確立し、ヒトCRPを添加した高脂血清および正常血清を試料として、CRP・LP複体の形成について検討しており、上記した本研究結果は先行研究結果¹³⁾と一致していた。さらに、先行研究において、CRPと高脂血清中のvery low density lipoproteins (VLDL) との結合を確認していることから¹³⁾、ヒトCRPは、高脂血清中のLPと複合体を形成することが明らかになった。

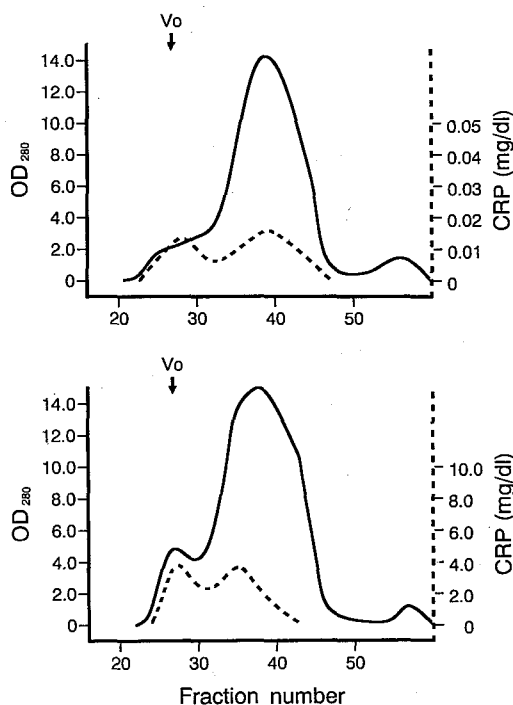


Fig. 2. Gel filtration of hyperlipidemic human sera and hyperlipidemic human sera in which human CRP was added to give a final concentration of 30mg/dl. Elution buffer was Tris-salin- Ca^{2+} solution.

2. CRPとTranexamic acidの結合性試験

CRP 3 mg をアフィニティーカラムに吸着させ、抗炎症剤として利用されている Tranexamic acid 110mM 添加 Buffer A によって溶出を試みた。その結果、カラムに吸着していた蛋白質 (CRP) は、fraction number 24 にピークをもって溶出されたが、ピーク後の吸光度の低下は緩やかであった (Fig. 3.)。

先行研究における EDTA・2Na による溶出実験では、CRP の溶出開始から溶出終了までの吸光度の変動は急峻であった⁷⁾。そのため、本研究における Tranexamic acid 110mM 添加 Buffer A では、CRP の溶出が不完全である可能性が考えられる。そこで、上記の溶出操作後に Buffer B をカラムに流したところ、蛋白質

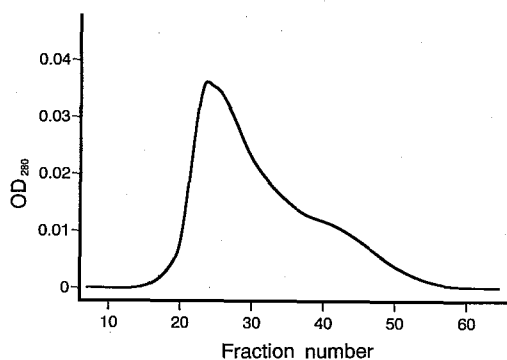


Fig. 3. Elution of human CRP which is bound to ϵ -Aminocaproic acid-sepharose 4B by 10mM Tranexamic acid containing Tris-salin- Ca^{2+} solution.

(CRP) はカラムから溶出されなかった。ゆえに、110mM の Tranexamic acid によって CRP の溶出は可能であり、Tranexamic acid が CRP のリガンドになり得ることが確認された。

3. Tranexamic acid による解離試験

Sephacry S-300 カラムクロマトグラフィーを用い、実際に臨床で抗炎症剤として用いられる濃度である 10mM に調整した Tranexamic

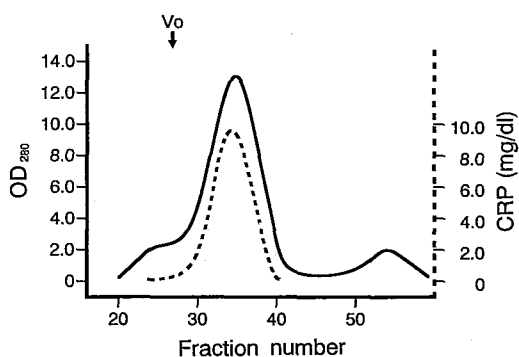


Fig. 4. Gel filtration of hyperlipidemic human sera and hyperlipidemic human sera in which human CRP was added to give a final concentration of 30mg/dl. Elution buffer was 10mM Tranexamic acid containing Tris-salin- Ca^{2+} solution.

acid 添加 Buffer C を溶出液として、CRP 添加高脂血清をゲル濾過した。その結果、CRP の溶出パターンは、Buffer C を溶出液として CRP 添加正常血清をゲル濾過した結果と同様の、一峰性を示した (Fig. 4.)。

この結果から、Tranexamic acid は、CRP と高脂血清中の LP との結合を競合阻害し、CRP・LP 複合体を解離させることが考えられる。

すなわち、CRP・LP 複合体は活性化マクロファージに取り込まれ易く、その後マクロファージは泡沫細胞に進展する可能性があるという¹³⁾、筆者らの先行研究結果を基に考察すると、アテローム硬化発生に関与する CRP・LP 複合体の形成を阻害する薬物として、CRP のリガンドとなりえる Tranexamic acid を活用できる可能性が示唆された。

しかし、桑島らによるアフィニティークロマトグラフィーによる CRP の結合特性の検討では⁷⁾、CRP の結合特性は、リガンドの構造、殊にリガンドのアームの長さ (炭素原子 5 つ以上)、およびリガンド先端の荷電に関係していると考察しており、 ϵ -Aminocaproic acid-agarose ゲルを用いた溶出実験では、ゲルに結合した CRP を Tranexamic acid 以外に、Acetylsalicylic acid や ω -Aminocaprylic acid 等で溶出可能であり、これらが CRP のリガンドであることを報告している。また本研究でも、Tranexamic acid が CRP のリガンドとなることを認め、さらに Tranexamic acid が、高脂血清内での CRP と LP の結合を阻止する可能性を示した。

以上のことから、陰性に荷電したカルボキシル基を末端に有し、炭素原子 5 つ以上から成る疎水性アームを持つペプチドが、CRP と LP の結合に対して発揮する競合阻害力を、Tranexamic acid が発揮する阻害力と比較し、より有効な CRP・LP 複合体の形成阻害剤について検討する必要があると考える。

Ⅲ. 結 語

現在、動脈硬化の治療薬として用いられている薬物には、クロフィブラート、コレステラチン、ニコチン酸、プロブコール、HMG-CoA 還元酵素阻害剤などの抗高脂血症薬などが挙げられる。ところが、高脂血症改善効果と動脈硬化性疾患の発生抑制効果とを比較すると、単に高脂血症の治療のみでは、動脈硬化性疾患の発生を予防するには不十分であることが報告されている。このことは、動脈硬化発生の多因子説を裏づけるものであり、多面的・総合的な治療ならびに予防の必要が改めて認識される。

本研究は、Tranexamic acid の特性に関する基礎的研究であるが、高脂血清内において CRP と LP の結合を解離することが可能な Tranexamic acid 等の抗炎症剤を利用した、アテローム硬化病変の発生予防に関する研究へ、今後さらに発展させていく予定である。

Ⅳ. 参考文献

- 1) Tillet, W. S. and Francis, T. Jr : Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus., J. Exp. Med., 52, 561-571, 1930.
- 2) Kushner, I. : The phenomenon of the acute response., Ann. N. Y. Acad. Sci., 389, 39-48, 1982.
- 3) Claus, D. R., Osmand A. P., and Gewurz, H. : Radioimmunoassay of human C-reactive protein and levels in normal sera., J. Lab. Clin. Med., 87(1), 120-128, 1976.
- 4) Volanakis, J. E. and Kaplan, M. H. : Specificity of C-reactive protein for choline phosphate residues of pneumococcal C-polysaccharide., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 136, 612-614, 1971.
- 5) Kaplan, M. H. and Volanakis, J. E. : Interaction of C-reactive protein complexes with the complement system. I. Consumption of human complement associated with the reaction of C-reactive protein with pneumococcal C

- polysaccharide and with the choline phosphatides, lecithin, and sphingomyelin., *J. Immunol.*, 112, 2135-2147, 1974.
- 6) Heidelberger, M., Gotschlich, E. C., and Higginbotham, J. D. : Inhibition experiments with pneumococcal C and depyruvylated type -IV polysaccharides., *Carbohydr. Res.*, 22(1), 1-4, 1972.
- 7) Kuwajima, S., Kisida, T., Noda, T., Izumi, Y., Naka, K., Matsui, T., and Okuda, K. : New Ligands for human C-reactive protein : calcium - dependent binding with ϵ - amino-caproic acid-agarose and calcium-independent binding with ω -aminohexyl-agarose., *Int. J. Tiss. Reac.*, 12(2), 71-76, 1990.
- 8) 岸田卓也, 桑島士郎, 野田忠文, 和泉良仁, 中恵一, 松井正, 奥田清 : C反応性蛋白 (CRP) のリガンド結合性のクロマトグラフィー的検討, *炎症*, 9(5), 369-374, 1989.
- 9) Pepys, M. B., Rowe, I. F., and Baltz, M. L. : C-reactive protein : binding to lipids and lipoproteins., *Int. Rev. Exp. Pathol.*, 27, 83-111, 1985.
- 10) Rowe, I. F., Soutar, A. K., Trayner, I. M., Thompson, G. R., and Pepys, M. B. : Circulating human C-reactive protein binds very low density lipoproteins., *Clin. Exp. Immunol.*, 58 (1), 237-244, 1984.
- 11) Reynolds, G. D. and Vance, R. P. : C-reactive protein immunohistochemical localization in normal and atherosclerotic human aortas., *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 111(3), 265-269, 1987.
- 12) Vlaicu, R., Rus, H. G., Niculescu, F., and Cristea, A. : Immunoglobulins and complement components in human aortic atherosclerotic intima., *Atherosclerosis*, 55(1), 35-50, 1985.
- 13) 喜多尾浩代 : ヒト C-Reactive Protein (CRP) の脂質代謝における役割—CRP・リポタンパク複合体のマクロファージによる取り込みについて—, *臨床化学*, 21(4), 231-244, 1992.
- 14) Kuwajima, S. and Okuda, K. : Affinity chromatography for C-reactive protein using p-nitro-phenyl-phosphorylcholine as a ligand., *Clin. Chim. Acta.*, 166, 101-102, 1987.